

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-205695

(43)公開日 平成6年(1994)7月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 0 7 K 15/28		8318-4H		
17/08		8318-4H		
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9050-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 12 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平5-297379	(71)出願人	000001926 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(22)出願日	平成5年(1993)11月2日	(72)発明者	西村 真治 大阪府守口市八雲北町3丁目10番19-1210号
(31)優先権主張番号	特願平4-321164	(72)発明者	西 裕史 大阪府寝屋川市若葉17-35 若葉ハイッ 102
(32)優先日	平4(1992)11月4日	(72)発明者	西村 将司 京都府京都市右京区西院春栄町53-14
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 好塩基球に結合するモノクローナル抗体、好塩基球の分離方法、好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法、及び好塩基球由来ケミカルメディエーター遊離試験法

(57)【要約】

【構成】以下の(1)～(4)の性質を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いる体液からの好塩基球の分離方法、好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法、及び好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離試験法。

(1) 好塩基球と反応する、(2) 担体に固相化後も抗体活性を保持する、(3) 該好塩基球のIgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離を阻害しない、(4) 該好塩基球の非特異的なケミカルメディエーター遊離を誘発しない。

【効果】本発明のモノクローナル抗体は、IgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離試験に適した好塩基球の分離に利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の性質を有するモノクローナル抗体。

- (1) 好塩基球と反応する、
- (2) 担体固相化後も抗体活性を保持する、
- (3) 該好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害しない、
- (4) 該好塩基球の非特異的なヒスタミン遊離を誘発しない、

【請求項2】 マウス免疫グロブリンのクラスがIgG 1またはIgMに属することを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 ハイブリドーマBA101シオノギ(FERM BP-4004)、BA20シオノギ(FERM BP-4005)、BA135シオノギ(FERM BP-4006)、およびBA312シオノギ(FERM BP-4007)によりそれぞれ産生されるモノクローナル抗体BA101、BA20、BA135、およびBA312よりなる群から選択される請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載のモノクローナル抗体を担体に固相化した固相化モノクローナル抗体。

【請求項5】 該担体がガラス又は合成樹脂製の粒状物、球状物、チューブ、プレートおよび磁性粒子よりなる群から選択される請求項4記載の固相化モノクローナル抗体。

【請求項6】 該磁性粒子がマグネチックビーズである請求項5記載の固相化モノクローナル抗体。

【請求項7】 請求項1、2又は3記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

【請求項8】 ハイブリドーマBA101シオノギ(FERM BP-4004)、BA20シオノギ(FERM BP-4005)、BA135シオノギ(FERM BP-4006)、およびBA312シオノギ(FERM BP-4007)よりなる群から選択される請求項7記載のハイブリドーマ。

【請求項9】 請求項4、5又は6記載の固相化モノクローナル抗体と体液とを反応させ、該体液中の好塩基球を該固相化モノクローナル抗体に結合させて捕捉することを特徴とする、好塩基球の分離方法。

【請求項10】 該体液が、血液、鼻汁、涙液、および唾液よりなる群から選択される請求項9記載の分離方法。

【請求項11】 請求項9又は10記載の方法により分離した好塩基球をアレルゲンまたは抗IgE抗体と反応させることを特徴とする、該好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法。

【請求項12】 該ケミカルメディエーターがヒスタミン、ロイコトリエンおよび血小板活性化因子(PAF)よりなる群から選択される請求項11記載の遊離方法。

【請求項13】 該アレルゲンが室内塵、花粉、食餌性アレルゲンおよび化学物質よりなる群から選択される請求項11記載の遊離方法。

【請求項14】 以下の工程を有する好塩基球からのケミカルメディエーター遊離試験法。

(1) 請求項4、5又は6記載の固相化モノクローナル抗体と体液とを反応させ、該体液中の好塩基球を該固相化モノクローナル抗体に結合させて捕捉し、該好塩基球を分離する工程、

(2) 工程(1)で分離した好塩基球をアレルゲンまたは抗IgE抗体と反応させて好塩基球からケミカルメディエーターを遊離させる工程、および

(3) 工程(2)で好塩基球から遊離したケミカルメディエーターの量を測定する工程、

【請求項15】 該ケミカルメディエーターがヒスタミン、ロイコトリエンおよび血小板活性化因子(PAF)よりなる群から選択されるものである請求項14記載の遊離試験法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、(1)好塩基球と反応し、(2)担体固相化後も抗体活性を保持し、(3)該好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害せず、さらに(4)該好塩基球の非特異的なヒスタミン遊離を誘発しないモノクローナル抗体、および該モノクローナル抗体が担体に固相化した固相化モノクローナル抗体を提供する。さらに本発明は、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いる体液からの好塩基球の分離方法、該分離方法により分離した好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法、及び好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離試験法を提供する。

【0002】

【従来の技術】白血球の一種である好塩基球はIgEの標的細胞であり、その顆粒中にヒスタミンを始めとする種々の化学伝達物質(ケミカルメディエーター)を貯蔵し、肥満細胞とともにアレルギー反応の中心的存在として注目されている。

【0003】通常、好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離機序は大きく2つに分けられる。その1つは好塩基球の膜表面のレセプターに結合したIgE同志がアレルゲンや抗IgE抗体により架橋され、その刺激により脱顆粒反応がおこりケミカルメディエーターが遊離するというもので、アレルギー反応による遊離がこれに相当する(以下、IgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離、と記す)。もう1つは、その遊離機序や意義は明らかにされていないが、直接好塩基球膜表面のIgEを架橋することなく生じる遊離で、対応するIgEを介した特異的な遊離反応に照らして、抗IgE抗体や、アレルゲンの非存在下でも起こるものである(以

下、非特異的なケミカルメディエーター遊離、と記す)。

【0004】アレルギー疾患の診断や病態解析にはIgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離を試験することが有用であり、その代表的な試験としてヒスタミン遊離試験がある。ヒスタミンはI型アレルギー反応を引き起こす特に重要なケミカルメディエーターであり、気管支平滑筋の収縮、血管透過性の亢進などの諸反応を惹起することが知られている。ヒスタミン遊離試験は、ヒト末梢血中の好塩基球表面にレセプターを介して結合した免疫グロブリンE (IgE) を、種々のアレルギーと反応させることにより、これに伴って遊離したヒスタミン量を測定する生物学的反応を利用した特徴ある検査法であり、他のアレルギー同定法である特異IgE試験(RAST)、皮膚試験等と異なって、アレルギー患者の原因アレルギー探索のより臨床症状に近い方法として有用である。

【0005】この末梢血を用いるヒスタミン遊離試験には全血を用いる方法と、洗浄白血球を用いる方法がある。全血法は、患者のアレルギー状態を総合的に把握する上で有用と考えられているが、好塩基球以外の他の血清成分がヒスタミン遊離の測定に影響を及ぼす可能性がある。このため、薬剤などの作用機序を研究したり、ヒスタミン遊離機構の基礎的研究をする場合など、正確な好塩基球の反応性を分析する場合には、通常洗浄白血球を用いる。しかし、洗浄白血球を分離するためには、デキストラン溶液にて赤血球を除去した後、2〜3回の遠心を伴った洗浄を行い、更に白血球数を調整するなどの煩雑な操作が必要であり、このため検査に必要な血液量も多くなり、日常検査として利用するには多くの難点がある。

【0006】また、好塩基球の脱顆粒反応と共に放出される物質の中には、ロイコトリエンや血小板活性化因子(PAF)などの、強力な血管透過性亢進作用・白血球遊走能を示すケミカルメディエーターの存在が知られており、アレルギーの病態解析を目的として、これら種々の好塩基球由来ケミカルメディエーターが基礎研究対象物質となってきている。しかし、これらのケミカルメディエーターは血液中に放出された場合速やかに代謝されてしまうものが多く、これらの測定を行う際には特に試料の取り扱いを迅速かつ厳密に行うことが重要な要件となってくる。このような好塩基球由来ケミカルメディエーターの多くは、現在分析が非常に難しい。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離には、アレルギー反応によるIgEを介した特異的な遊離と、それ以外の非特異的な遊離があり、アレルギー疾患の診断にはIgEを介して特異的に遊離されたケミカルメディエーターを測定することが必要である。しかし、前述のよう

に血清成分の影響を受けることなくヒスタミン遊離試験を行うためには白血球を分離しなければならないため、煩雑な操作と多量の血液が必要であり、日常の検査には不向きである。さらに、ヒスタミン以外のケミカルメディエーターについても試料の取り扱いが煩雑であるので現在分析を行うのが困難な状況である。

【0008】そこで本発明者らは、血液中から好塩基球を分離し、ヒスタミン等の遊離試験に用いれば上記の問題を解決できるのではないかと考え研究を行った。これまで、好塩基球の分離・精製法としては、比重遠心法で予め好塩基球の密度を高めた試料から好塩基球以外の細胞成分に反応する抗体を結合した磁性粒子を用いて不純物細胞を除くことにより好塩基球の精製を行うP. J. フレデリック(P. J. Frederik)らの方法 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Methods) 149, 207 (1992)] 等がある。しかし、この方法は目的とする好塩基球そのものを分離する精製法ではなく、夾雑物を除去することによる精製法であるので、効率が悪い上に操作性も煩雑である。

【0009】一方、好塩基球そのものに反応する抗体も多数知られており [例えば、P. バレント (Valent) ら、インターナショナル・アーカイブズ・アレルギー・アプライド・イムノロジー (Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.) 91, 198 (1990)]、またヒト好塩基球に対して特異的な反応を示すモノクローナル抗体も報告されている [M. P. ボジャー (Bodger) ら、ブラッド (Blood) 69, 1414 (1987)]。しかし、かかる好塩基球反応性抗体を固相担体に結合させ、ヒト好塩基球の分離に利用した試みの成功例は知られておらず、したがって、当然にそのような方法で分離したヒト好塩基球をヒスタミンなどのケミカルメディエーター遊離試験に用いた例も見られない。

【0010】この事実、好塩基球反応性抗体を固相担体に結合させることによる好塩基球反応性の喪失等による失敗も考えられる (後述実験例1 (1)) が、最も大きな原因は、かかる好塩基球反応性抗体を利用して分取された好塩基球がダメージを受けており、IgEを介した特異的なヒスタミン遊離が阻害される場合 [例えば、P. J. フレデリックら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Methods) 149, 213 (1992)、及びJ. T. シュレーダー (J. T. Schroeder) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Methods) 133, 269 ~ 277 (1990)] やIgEを介した特異的なヒスタミン遊離に比して非特異的なヒスタミン遊離が著しく高くなったため、ヒスタミン遊離反応の定量等の使用に耐え得なくなっている場合が多いことが考えられる (後述実験例1 (2))。P. J. フレデリックらが、好塩基球以外の細胞成分と反応する抗体を用いて好塩基球の精製を行うという一見迂遠な方法を採ったのも上述の欠点を回避するためであったと解され

る。

【0011】

【課題を解決するための手段】しかしながら、好塩基球そのものをターゲットとし好塩基球反応性抗体を用いて好塩基球の分離精製を行うことができれば、簡易かつ高精度の精製が達成可能となるはずである。そこで、本発明者らは、かかる目的に使用し得る抗体すなわち好塩基球と反応するモノクローナル抗体であって、固相担体と結合した後も好塩基球に対する反応性を有し、かつ、好塩基球と結合後も当該好塩基球にダメージを与えることのない、すなわちIgEを介した特異的なヒスタミン遊離にも非特異的なヒスタミン遊離にも有意の影響を与えることのない特性を有するモノクローナル抗体の探索を鋭意行った。その結果、目的のモノクローナル抗体の調製に成功した。そして、かかる抗体を担体に固相化して体液と反応させ、該モノクローナル抗体により該体液中の好塩基球を捕捉した後、未反応の体液を除去することにより容易に好塩基球を分離する方法を確立し、分離した好塩基球にアレルゲンまたは抗IgE抗体を反応させてヒスタミンを遊離させることに成功した。さらに本発明者らは、該抗体を用いて分離した好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離試験法を確立して、本発明を完成させるに至った。

【0012】すなわち、本発明は以下の性質を有するモノクローナル抗体を提供する。

(1) 好塩基球と反応する、(2) 担体固相化後も抗体活性を保持する、(3) 該好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害しない、(4) 該好塩基球の非特異的なヒスタミン遊離を誘発しない、

【0013】本発明が提供する上記(1)、(2)、(3)および(4)の性質を有するモノクローナル抗体において、(1) 好塩基球と反応する、とは該モノクローナル抗体が好塩基球の表面抗原と反応することを意味する。

【0014】また、(2) 担体固相化後も抗体活性を保持する、とは該モノクローナル抗体を担体に結合させた後も好塩基球の捕捉能を失わないことを意味する。該担体としては、例えば、ガラスまたは合成樹脂製の粒状物(ビーズ)あるいは球状物(ボール)、チューブ、プレート、マグネチックビーズのような磁性粒子など、通常抗体を固相化するとき用いる担体であれば全て用いることができるが、好ましくは磁性粒子を用いるのが良い。

【0015】固相化抗体の好塩基球捕捉能は、固相化したモノクローナル抗体が好塩基球と結合したか否かを検定することにより判定され、具体的にはヒスタミンを指標とし、次のような方法により行う。まず、マグネチックビーズに固相化した、ヒト好塩基球と反応するモノクローナル抗体をヒト血液と反応させる。次いで磁石でビーズを集めて上清を除いた後、ヒスタミン遊離用緩衝液(塩化カルシウム、塩化マグネシウム等を含むHEPE

S緩衝液)を加え凍結融解を数回繰り返し、その上清の総ヒスタミン量を既知の方法、例えばHPLC法によるヒスタミン測定システム[Y. ツルタ(Tsuruta)ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー(J. Chromatogr.) 224, 105 (1981)](島津製作所)により測定し、ヒスタミンが検出された抗体を好塩基球捕捉能を有する抗体として選択する。

【0016】また、(3) 該好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害しないとは、該モノクローナル抗体と結合した好塩基球が、血液中で本来有するIgEを介した特異的なヒスタミン遊離能を実質的に維持していることを意味する。実質的に維持するか否かは、本発明において発見されたモノクローナル抗体BA312との比較実験によって確認することができる。すなわち、BA312により捕捉された好塩基球は血液中で本来有するヒスタミン遊離能を維持している(後述実験例2)から、被検固相化モノクローナル抗体を固相化BA312と同条件で好塩基球と反応させ、得られた両モノクローナル抗体結合好塩基球を同条件下で抗IgE抗体処理を行い遊離されたヒスタミン量がBA312のその60%以上である場合に当該モノクローナル抗体は「該好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害しない」とものと判定し、本発明の対象となると決定する。

【0017】さらに、(4) 該好塩基球の非特異的なヒスタミン遊離を誘発しない、とは該モノクローナル抗体と結合した好塩基球からの非特異的なヒスタミン遊離の量が、IgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量の30%以下であることを意味する。

【0018】非特異的なヒスタミン遊離の量は、該好塩基球に適当な溶媒、例えば塩化カルシウム、塩化マグネシウム、ヒト血清アルブミン(HSA)等を含むヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液(ヒスタミン遊離用緩衝液)を加え10~50℃で10~60分間反応させることにより遊離するヒスタミンの量を既知の方法、例えばHPLC法により測定することにより得ることができる。

【0019】IgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量は、該好塩基球とヒスタミン遊離用緩衝液で調製した抗IgE抗体とを上と同一の温度・反応時間の下で反応させることにより遊離するヒスタミンの量を、上と同一の方法・条件の下で測定することにより得ることができる。

【0020】以下に本発明のモノクローナル抗体の作製方法を簡単に示す。

(1) ハイブリドーマの調製

マウスをヒト好塩基球で免疫する。免疫は、ヒト好塩基球を数週間おきにマウスの腹腔、皮下、または静脈に数回繰り返し接種することにより行う。免疫されたマウスから抗体産生細胞を得、これと骨髓腫細胞を融合しハイ

ブリドーマを作製する。得られたハイブリドーマの内ヒト好塩基球に反応する抗体を産生するハイブリドーマのウエルを選択する。

【0021】選択されたハイブリドーマをクローニングし、出現したハイブリドーマクローンの産生した抗体を、ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体が予め結合してあるマグネチックビーズに結合した後、ヒト血液中の好塩基球の捕捉能、及び分離した好塩基球のヒスタミン遊離に関する特性を検定する。捕捉能の検定は、前述の方法で行うことができる。

【0022】分離した好塩基球のヒスタミン遊離に関する特性の検定は、捕捉能の検定と同様マグネチックビーズに固相化した該抗体をヒト血液と反応させ、磁石でビーズを集めて上清を除いた後、前述の方法に従って非特異的なヒスタミン遊離の量とIgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量を測定し、IgEを介した特異的なヒスタミン遊離が阻害されず、かつ非特異的なヒスタミン遊離が促進されていない抗体すなわち非特異的なヒスタミン遊離の量がIgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量の30%以下、好ましくは10%以下となった抗体を選択する。

【0023】このようにして、担体に結合後も抗体活性を失わず好塩基球の捕捉能を有しており、かつ分離した好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離を阻害せず、かつ非特異的なヒスタミン遊離を誘発しない抗体を産生するハイブリドーマクローンを選択し、これを培養してモノクローナル抗体を回収する。

【0024】上記の免疫法、細胞融合法、融合細胞の選択、クローニングなどは公知の通常の方法によって行うことができる。

【0025】(2)モノクローナル抗体の作製

選択したハイブリドーマをインビトロ(in vitro)培養法、またはインビボ(invivo)培養法により増殖させ、モノクローナル抗体を得る。インビトロ培養法としては、ハイブリドーマを牛胎児血清を含むRPMI 1640 (完全RPMI 1640)で増殖限界になるまで培養し、その培養上清を回収することによってモノクローナル抗体を得ることができる。インビボ培養法としては、予めプリステンを腹腔内投与処理したマウスの腹腔にハイブリドーマを移植し、数週後にマウスの腹部肥大を確かめてその腹水を採取し、腹水からIgG、若しくはIgM画分を硫酸アミン、DEAEセファロースカラム等の既知の方法を適宜組み合わせで分離・精製することによってモノクローナル抗体を得ることができる。

【0026】上記方法により得られた本発明のモノクローナル抗体BA101、BA20、BA135、およびBA312を産生するハイブリドーマは、1992年9月10日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)にある通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、それぞれ「BA101シオノギ」

(微工研条寄第4004号、FERM BP-4004)、「BA20シオノギ」(微工研条寄第4005号、FERM BP-4005)、「BA135シオノギ」(微工研条寄第4006号、FERM BP-4006)、「BA312シオノギ」(微工研条寄第4007号、FERM BP-4007)として、ブダベスト条約に基づき寄託されている。このように本発明のモノクローナル抗体は、例えば寄託されたハイブリドーマにより産生されるものが挙げられるが、上述した(1)~

10 (4)の性質を有しているモノクローナル抗体であればいずれも本発明の範囲である。好ましくはモノクローナル抗体BA312が用いられる。

【0027】本発明のモノクローナル抗体は、ヒト好塩基球を含む白血球と反応し、ヒト赤血球とは反応しない。さらに本発明のモノクローナル抗体は、担体に固相化した後も好塩基球を十分に捕捉することができ、捕捉した好塩基球の非特異的なケミカルメディエーターの遊離を誘発せず、IgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離を阻害しない。また、本発明のモノクローナル抗体は、前記のような担体に結合させて得られる固相化モノクローナル抗体として有利に用いることができる。モノクローナル抗体を担体に結合させて固相化させる方法は、特に限定されるものではなく、公知の方法、例えば[T. リー(Lea)ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. Immunol.) 22, 207 (1985)]により行うことができる。例えば、モノクローナル抗体をアンコーテッド、又はトシル基のような化学的活性基を持つ化合物または抗マウス免疫グロブリンでコートされた固相担体と0~50℃、好ましくは4~40℃で5分~72時間、好ましくは30分~48時間反応させる。

【0028】本発明はまた、前記のようにして得られる本発明の固相化モノクローナル抗体と体液とを反応させ、該体液中の好塩基球を該固相化モノクローナル抗体に結合させて捕捉することを特徴とする、好塩基球の分離方法を提供する。

【0029】該体液としては、血液、鼻汁、涙液、唾液などが挙げられるが、好ましくは血液を用いる。

【0030】ところで磁性粒子に抗体を結合させて目的の細胞を分離する方法は、G. ゴーダーナックらの報告[G. ゴーダーナック(Gaudernack)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods) 90, 179 (1986)]など、広く知られている。また、比重遠心法で予め好塩基球の密度を高めた試料から、好塩基球以外の細胞成分に反応する抗体を結合した磁性粒子を用いて不純物細胞を除くことにより好塩基球の精製を行う方法も、P. J. フレデリックらにより報告されている[P. J. フレデリック(Frederic)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods) 149, 207 (1992)]が、本発明とは、好塩基球に

対する抗体を用いるのか、好塩基球以外の細胞に対する抗体を用いるのかという部分で本質的な相違がある。

【0031】一方、本発明の好塩基球の分離方法は、本発明のモノクローナル抗体を担体、例えば磁性粒子に、直接または抗マウス免疫グロブリンを介して固相化して抗体結合磁性粒子とし、これを体液、好ましくは血液と0～50℃、好ましくは15～40℃で短時間(1～60分)反応させた後、磁石を用いて磁性粒子を引き寄せ、未反応の試料を除去するという簡便な操作で好塩基球を高濃度で含む細胞集団を調製分離することができる。

【0032】本発明はまた、本発明の好塩基球の分離法により分離した好塩基球をアレルゲンまたは抗IgE抗体と反応させることを特徴とする、該好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法を提供する。

【0033】アレルゲンとしては、室内塵や花粉などの吸入性アレルゲンや、食肉や卵などの食餌性アレルゲンをはじめとして、その他化学物質など、通常アレルギー診断で用いられるものを、適宜必要に応じて用いることができる。

【0034】該好塩基球とアレルゲンまたは抗IgE抗体との反応は10～50℃、好ましくは25～40℃で0.5～300分間、好ましくは10～60分間行う。

【0035】本発明はさらに、以下の(1)～(3)の工程よりなる好塩基球からのケミカルメディエーター遊離試験法を提供する。

(1) 本発明の固相化モノクローナル抗体と体液とを反応させ、該体液中の好塩基球を該固相化モノクローナル抗体に結合させて捕捉し、該好塩基球を分離する工程、

(2) 工程(1)で分離した好塩基球をアレルゲンまたは抗IgE抗体と反応させて好塩基球からケミカルメディエーターを遊離させる工程、および(3) 工程(2)で好塩基球から遊離したケミカルメディエーターの量を測定する工程、

【0036】上記(1)および(2)はそれぞれ前記の本発明の好塩基球の分離方法および好塩基球からのケミカルメディエーターの遊離方法に従って行うと良い。

【0037】上記(3)の遊離したケミカルメディエーターの量の測定は、目的とするケミカルメディエーターに応じて、適宜既知の方法により測定すればよい。例えば、ヒスタミンの場合はHPLC法によるヒスタミン測定システム [Y. ツルタ (Tsuruta)ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J. Chromatogr.) 224, 105 (1981)] (島津製作所) により、ロイコトリエンおよびPAFの場合は、それぞれ [E. ヘイズ (Hayes)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) 131, 429 (1983)、及び [M. A. スマル (Smail)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Methods) 128, 183 (1990)] により測定することができる。

即ち、HPLCによるヒスタミンの測定は、例えば次のようにして行う。陽イオン交換樹脂を充填したカラムに試料を通じ、分離溶出したヒスタミンに0.1%オルソフタルアルデヒドとNaOHを加えて45℃で反応させ、ヒスタミンを蛍光体とする。つぎにH₂SO₄と反応させ、蛍光体の安定化と蛍光強度の増強を行った後、蛍光強度を測定する。

【0038】また、RIAによるロイコトリエンの測定は、試料または標準の非標識ロイコトリエン、抗ロイコトリエン抗体、³H標識ロイコトリエンを4℃、5～24時間反応させた後、デキストランコーテッドチャーコールと水中10分間反応させる。遠心後、上清を分取し、放射活性を測定する。また、RIAによるPAFの測定は、試料または標準の非標識PAF、抗PAF抗体、¹²⁵I標識PAFと二次抗体を室温で5～24時間反応させた後、遠心分離で得られた沈みの放射活性を測定する。また、ヒスタミンの測定法についても、RIAによって測定することができる。RIAで測定する場合、例えば試料または標準の非標識ヒスタミン、抗ヒスタミン抗体、¹²⁵I-標識ヒスタミンを0～40℃、好ましくは0～10℃で5分～48時間、好ましくは30分～24時間反応させる。その後B/F分離剤、例えばポリエチレングリコールを加えて水中10分間反応を行い、遠心で得られた沈みの放射活性を測定する。

【0039】さらに、ヒスタミンの測定法としてEIAによって行うこともできる。即ち、サンドイッチ法、競合法、ELISAなど公知の酵素免疫測定法は全て用いることができるが、好ましくは例えば、クノックスパンバイク (Knox Van Dyke)らによって報告される方法 (Luminescence Immunology and Molecular Application, CRC Press pp2～10, 1990) に従って測定する。すなわち、試料、ビオチン標識した標準ヒスタミン、酵素標識抗ヒスタミン抗体の混合物を、アビジンを固相化した担体と反応させる。洗浄後、アビジン固相化担体に結合した、ビオチン標識ヒスタミン-酵素標識抗ヒスタミン抗体複合体の酵素活性を測定する。担体および酵素は、酵素免疫測定法で通常用いられるものは全て用いることができる。好ましくは担体としてはマイクロプレート、酵素としては西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いる。

【0040】本発明の試験法においては、分離した好塩基球からの非特異的なケミカルメディエーター遊離の影響を除去するため、前述の方法に従って総ケミカルメディエーター量 (総ヒスタミン量の測定方法に準じる)、および非特異的なケミカルメディエーター遊離の量も同時に測定し下記式：

【0041】

【数1】

特異的ケミカルディエーター遊離率(%) =

$$\frac{\text{IgE 特異的遊離ケミカルディエーター量} - \text{非特異的遊離ケミカルディエーター量}}{\text{総ケミカルディエーター量} - \text{非特異的遊離ケミカルディエーター量}} \times 100$$

【0042】により1gEを介した特異的なケミカルディエーター遊離率を算出することが好ましい。

【0043】

【実施例】以下、実施例および実験例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

1. 好塩基球に反応するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫

8週齢の雌BALB/cマウス2匹に、それぞれ 1×10^6 個のヒト好塩基球を腹腔内投与し、以降3週間毎に3回、それぞれ 1×10^6 個のヒト好塩基球を腹腔内投与した。

【0044】(2) 細胞融合

最終免疫の3日後に、2匹のマウスから脾臓を摘出し、RPMI培地を用いて細胞浮遊液を調製した。この 2×10^8 個の脾細胞と 6×10^7 個の骨髓腫細胞NS-1とを混合し、遠沈後、沈殿に50%ポリエチレングリコール(平均分子量4000)1mlを緩やかに攪拌しながら加え、更に1分間攪拌した。RPMI培地1mlを1分間を要して加え、同じく1mlを追加した後、更に、7mlを3分間を要して加えた。遠沈後、沈殿を15%牛胎児血清を含むRPMI培地(完全RPMI培地)40mlに浮遊させ、96穴マイクロ培養プレート4枚の各ウェルに、0.1mlずつ接種し、7%炭酸ガスの存在下、37℃で培養した。24時間後、ヒポキサンチン100μM、アミノプテリン0.4μM、チミジン16μMを含む完全RPMI培地(HAT培地)0.1mlを加えた。培養開始後、2、3、5及び8日後に、培養上清0.1mlを捨て、HAT培地0.1mlを加えた。11及び14日目に、培養上清0.1mlを捨て、ヒポキサンチン100μM、チミジン16μMを含む完全RPMI培地(HT培地)0.1mlを加えた。計384の全てのウェルからハイブリドーマのコロニーが出現した。

【0045】(3) ハイブリドーマの選択

培養ウェル中のハイブリドーマを完全RPMI培地で培養し、その培養上清中の特異抗体産生の有無を次のようにして検出した。

【0046】ヒト末梢血20mlに、5%デキストラン生理食塩液を5ml加えて、赤血球を沈澱させた後、上清の白血球を分離した。この白血球から、比重1.07及び1.08に調製したパーコールを用いて、不連続比重遠心法により、比重1.07~1.08からなる細胞を分離した。分離細胞を、アルシアンブルー法[S. G. ハリエット (Harriet) ら、ブラッド (Blood) 46,

279 (1975)] により染色して好塩基球数を算定し、好塩基球として 4×10^5 個/mlとなるように、0.8%塩化ナトリウム、0.037%塩化カリウム、及び0.03%ヒト血清アルブミン(HSA)を含む10mMヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液(pH7.4)(HA-HEPES緩衝液)で調製した。試験管に、好塩基球数として 2×10^5 個となるように分離細胞を分注した。これにハイブリドーマの培養上清を50μl加え、37℃で1時間反応させた。HA-HEPES緩衝液で1回洗浄の後、フルオレッセンイソチオシアネート(FITC)標識ヤギ抗ヒトIgE抗体、及びフィコエリスリン標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体の混合液50μlを加えて、室温で1時間反応させた。HA-HEPES緩衝液で1回洗浄の後、蛍光顕微鏡による観察を行い、FITC標識された細胞が、フィコエリスリンによっても標識されているかどうかを判定した。このようにして、FITC標識された好塩基球に対して、ハイブリドーマの培養上清に含まれるモノクローナル抗体が反応するものを、100ウェル選択した。

【0047】上記の如く選択したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした後、フラスコ培養によりそれぞれ増殖限界まで培養を行った。この培養上清1mlを、ヒッジ抗マウス免疫グロブリン抗体が予め結合してあるマグネチックビーズ15mgに加えて、緩やかな攪拌を行いながら4℃で16時間反応させて、モノクローナル抗体固相化マグネチックビーズを得た。これらのモノクローナル抗体固相化マグネチックビーズを用いて、下記実施例4に記載の方法に従い、ヒト末梢血からの好塩基球捕捉能、及び分離された好塩基球のIgE特異的なヒスタミン遊離と、非特異的なヒスタミン遊離に関する性質を調べた。その結果、前記の特性を有し、後記実験例から明らかなように、本発明のヒト好塩基球を含む細胞集団の分離と、分離細胞のヒスタミン遊離試験方法に適したモノクローナル抗体BA101、BA20、BA135及びBA312を産生するハイブリドーマBA101シオノギ(FERM BP-4004)、BA20シオノギ(FERM BP-4005)、BA135シオノギ(FERM BP-4006)及びBA312シオノギ(FERM BP-4007)を選択した。

【0048】また、上記4種のモノクローナル抗体の属するマウス免疫グロブリンのクラスを調べた結果、BA20、BA101、及びBA135はIgG1に属し、BA312はIgMに属することが判明した。

【0049】(4) モノクローナル抗体の作製

(a) *in vitro* 培養法

ハイブリドーマを完全RPMI培地で増殖限界 (1×10^6 個/ ml) になるまで培養し、その培養上清を回収した。

【0050】(b) *in vivo* 培養法

予めプリステン0.5mlで腹腔内投与処理したBALB/cマウスに、 5×10^6 個のハイブリドーマを腹腔内に移植した。約3週間後、マウスの腹部肥大を確かめて、その腹水を採取した。

【0051】(5) モノクローナル抗体の精製

(a) プロテインAアフィニティークロマトグラフィー法

前工程で得られた腹水を18%硫酸ナトリウム溶液で塩析し、生じた沈澱を0.01Mホウ酸緩衝食塩液 (pH 8.0) に溶解後、同液にて透析した。塩析により得られたモノクローナル抗体20mgを0.01Mホウ酸緩衝食塩液 (pH 8.0) 2mlに溶かし、プロテインA-セファロース [ファルマシア社 (Pharmacia AB)] のカラム ($1.6 \times 5 \text{ cm}$) に吸着させた。まず、0.01Mホウ酸緩衝食塩液 (pH 8.0) 約50mlで不純物を流出し、次いで0.01Mクエン酸緩衝食塩液 (pH 4.0) 約100mlで溶出して、精製モノクローナル抗体BA20、BA101及びBA135を得た。

【0052】(b) セファロースCL-4Bゲルクロマトグラフィー法

前記塩析により得られたモノクローナル抗体20mgを0.01Mホウ酸緩衝食塩液2mlに溶かし、セファロースCL-4B [ファルマシア社 (Pharmacia AB)] のカラム ($1.6 \times 70 \text{ cm}$) に通して分画し、メインピークを分取して、精製モノクローナル抗体BA312を得た。

【0053】2. モノクローナル抗体の2次抗体結合ビーズへの固相化

ダイナビーズ M-450 ヒツジ抗マウス免疫グロブリン [ダイナル社 (Dynal)] の30mg・beads/ ml 懸濁液を、攪拌後1ml試験管に分取した。磁石でビーズを集め上清を除いた後、ハイブリドーマ培養上清1mlを加え、緩やかな攪拌を行いながら4℃で16時間反応を行った。磁石でビーズを集め上清を除いた後、HA-HEPES緩衝液で4回、4℃で30分間ずつ緩やかな攪拌を行いながら洗浄して、モノクローナル抗体固相化マグネチックビーズを得た。また、ハイブリドーマ培養上清の代わりに、HA-HEPES緩衝液で調製した精製モノクローナル抗体 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 1mlを加えて、上記と同様の方法でモノクローナル抗体固相化マグネチックビーズを得た。

【0054】3. モノクローナル抗体のアンコーテッドビーズへの固相化

ダイナビーズ M-450 アンコーテッド [(ダイナル社 (Dynal))] の30mg・beads/ ml 懸濁液を、攪

拌後1ml試験管に分取した。磁石でビーズを集め、上清を除いた後、BA312の0.05Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.5) 溶液 ($0.3 \text{ mg}/\text{ml}$) 1mlを加え、良く攪拌した。緩やかな攪拌を行いながら、4℃で16時間反応を行った。磁石でビーズを集め、上清を除いた後、0.5% HSAを含む0.01M HEPES緩衝液 (pH 7.4) で5分間ずつ4回洗浄を行い、更にHA-HEPES緩衝液で4℃で16時間洗浄を行い、BA312固相化マグネチックビーズを得た。

10 【0055】4. モノクローナル抗体固相化マグネチックビーズによる細胞分離と、ヒスタミン遊離反応

EDTA採血管に採血した健常人血液10mlに、HA-HEPES緩衝液40mlを加えて20%血液を調製した。ハイブリドーマBA20シオノギ、BA101シオノギ、BA135シオノギ及びBA312シオノギの培養上清をそれぞれ固相化したマグネチックビーズを、HA-HEPES緩衝液で3mg・beads/ ml となるように調製した。20%血液を試験管に500 μl ずつ分注し、ここに上記BA20、BA101、BA135及びBA312固相化マグネチックビーズ50 μl を加え、室温で緩やかな振盪条件下、5分間反応を行った。磁石でビーズを集め上清を除いた後、HA-HEPES緩衝液500 μl で1回洗浄を行った。洗浄終了後、0.5mM塩化カルシウム、0.25mM塩化マグネシウム、0.1%グルコース、0.9%塩化ナトリウム、0.035%重炭酸ナトリウム、及び0.1% HSAを含む20mM HEPES緩衝液 (pH 7.0) (ヒスタミン遊離用緩衝液)、若しくはヒスタミン遊離用緩衝液で4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製されたモノクローナル抗ヒトIgE抗体 (HE-69B) 500 μl を加えて攪拌を行った。分離細胞の総ヒスタミン量は、ヒスタミン遊離用緩衝液を加えた検体で凍結融解を3回繰り返して行ったものを検体とした。IgE特異的なヒスタミン遊離反応は、モノクローナル抗ヒトIgE抗体を加えた検体を、37℃で1時間反応させて行った。また、非特異的なヒスタミン遊離反応は、ヒスタミン遊離用緩衝液を加えた検体を37℃で1時間反応させて行った。反応終了後攪拌して、1500rpm \times 5分間遠沈した後、上清300 μl を分取した。遊離ヒスタミン量の測定は、HPLC法によるヒスタミン測定システム [Y. ツルタ (Tsuruta) ら、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J. Chromatogr.) 224, 105 (1981)] (島津製作所) により行った。

【0056】表1に示すように、BA20、BA101、BA135及びBA312固相化マグネチックビーズで分離した細胞の総ヒスタミン量を測定したところ、すべての抗体においてヒスタミンが検出され、好塩基球の分離能を有していることが分かった。また、図1に示すように分離細胞のIgE特異的なヒスタミン遊離率は良好であり、なおかつ非特異的なヒスタミン遊離は、特

異的なヒスタミン遊離に比較して、30%以下に抑えられていた。 *【0057】
*【表1】

	BA20	BA101	BA135	BA312	非固相ビーズ
血液検体	++	++	++	++	-

好塩基球の分離能 ++ : 有り - : なし

【0058】実験例

1. CD抗体と、本発明モノクローナル抗体との比較

(1) 好塩基球捕捉能

P. バレントらの報告 [P. バレント (Valent) ら、インターナショナル・アーカイブス・アレルギー・アブライド・免疫ロジー (Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.) 91, 198 (1990)]に基づいて、好塩基球表面に良く発現する抗原に反応するCD抗体、即ちCD9抗体 (TP82、ニチレイ社)、CD11b抗体 (BEAR1、イムノテック社)、CD13抗体 (MCS2、ニチレイ社)、及びCD32抗体 (2E1、イムノテック社) の各抗体を用いて、上記実施例の2に示した方法により、※20

※抗体固相化マグネチックビーズの調製を行った。上記C

10 D抗体、及びBA20、BA312固相化マグネチックビーズを用いて実施例の4と同様の方法により特定の細胞集団の分離を行い、分離細胞由来の総ヒスタミン量を測定した。

【0059】表2に示すように、CD9抗体、CD11b抗体、及びBA20、BA312では良好な好塩基球捕捉を認めたが、CD13抗体、及びCD32抗体では、好塩基球の分離が認められなかった。

【0060】

【表2】

	CD9	CD11b	CD13	CD32	BA20	BA312
血液検体A	++	++	-	-	++	++
血液検体B	++	++	-	-	++	++

好塩基球捕捉能 ++ : 有り - : なし

【0061】(2) 分離細胞のヒスタミン遊離能

上記実験例の1. (1) で検討したCD抗体の内、好塩基球捕捉能の認められたCD9抗体、CD11b抗体、及びBA20、BA312の各抗体固相化マグネチックビーズによる分離細胞のヒスタミン遊離能、即ち、総ヒスタミン量、IgE特異的遊離ヒスタミン量、及び非特異的遊離ヒスタミン量の3項目を、20例の健常人血液を用いて、上記実施例の4と同様の方法で測定した。

【0062】その結果、全ての抗体で好塩基球の分離を確認するとともに血液検体毎の差はあるものの、全ての抗体でIgE特異的なヒスタミン遊離を認めた。

【0063】本発明においては、マグネチックビーズ 40 に固相化した抗体により捕捉・分離された好塩基球のIgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量に対する非特

異的なヒスタミン遊離の量の比率が30%以下であれば該抗体はケミカルメディエーター遊離試験法に有用であると考えられ、10%以下では特に有用と考えられる。CD9抗体及びCD11b抗体では、IgE特異的なヒスタミン遊離と比較して、著しく高い非特異的ヒスタミン遊離を示す検体が頻発しているため、表3に示すように、上記比率も30%を大きく上回っておりこれらの分離細胞からIgE特異的なヒスタミン遊離に関する解析を行うことは極めて困難であった。これに対して、本発明のモノクローナル抗体であるBA312はこの比率が7.5%と極めて優れたものであった。

【0064】

【表3】

モノクローナル抗体	CD9	CD11b	BA20	BA312
Non-Spec./Spec. (%)	46.9	39.7	22.0	7.5
SD	17.6	28.5	15.1	5.3

Non-Spec. / Spec. : IgEを介した特異的なヒスタミン遊離の
量に対する非特異的なヒスタミン遊離の
量の比率

SD : 標準偏差

【0065】以上より、好塩基球捕捉率が高く、IgE特異的なヒスタミン遊離も良好で、なおかつ非特異的なヒスタミン遊離が最も抑えられているのはBA20、及びBA312固相化マグネチックビーズによる分離細胞であった。とりわけBA312固相化マグネチックビーズによる分離細胞は、本発明のヒト血液からの好塩基球の分離、及び該分離細胞のヒスタミン遊離試験を行うのに最も適していた。

【0066】2. 全血と、分離細胞によるヒスタミン遊離試験

健康人ボランティア血液1例を用いて、全血と分離細胞によるヒスタミン遊離試験の比較検討を行った。全血による方法では、まずヘパリン採血管に血液10mlを採血した。この血液100μlずつを試験管に分注し、これにヒスタミン遊離用緩衝液、若しくはヒスタミン遊離用緩衝液で50000、5000、500、50及び5ng/mlとなるように調製したモノクローナル抗ヒトIgE抗体(HE-69B)を、それぞれ400μlずつ加えて攪拌を行った(モノクローナル抗ヒトIgE抗体は、終濃度40000、4000、400、40及び*30

*4ng/mlとなる)。総ヒスタミン量は、ヒスタミン遊離用緩衝液を加えた検体で凍結融解を3回繰り返して行ったものを検体とした。IgE特異的なヒスタミン遊離反応は、モノクローナル抗ヒトIgE抗体を加えた検体を、37℃で1時間反応させて行った。また、非特異的なヒスタミン遊離反応は、ヒスタミン遊離用緩衝液を加えた検体を37℃で1時間反応させて行った。反応終了後攪拌して、1500rpm×5分間遠沈した後、上清300μlを分取した。遊離ヒスタミン量の測定は、HPLC法によるヒスタミン測定システム(島津製作所)により行った。

【0067】分離細胞による方法では、上記実施例の4の方法と同様の方法で細胞分離と、分離細胞のヒスタミン遊離試験を行った。モノクローナル抗ヒトIgE抗体(HE-69B)は、ヒスタミン遊離用緩衝液で40000、4000、400、40及び4ng/mlとなるよう調製し、これによるヒスタミン遊離率を求めた。特異的なヒスタミン遊離率は、次式にて算出される。

【0068】

【数2】

特異的なヒスタミン遊離率(%) =

$$\frac{\text{IgE 特異的な遊離ヒスタミン量} - \text{非特異的な遊離ヒスタミン量}}{\text{総ヒスタミン量} - \text{非特異的な遊離ヒスタミン量}} \times 100$$

総ヒスタミン量 - 非特異的な遊離ヒスタミン量

×100

【0069】図2に示すように、特異的なヒスタミン遊離率は、全血による方法と、分離細胞による方法とで同等の結果を得た。このことから、本発明のモノクローナル抗体を用いて得られた分離細胞は、血液中で本来有するヒスタミン遊離能を維持していることがわかった。

【0070】3. 臨床検体による分離細胞のヒスタミン遊離試験

卵白が原因アレルゲンである小児アトピー性皮膚炎患者血液検体2例に関して、上記実施例の3に示した方法で調製したBA312固相化マグネチックビーズを用いて、上記実施例の4と同様の方法で細胞分離と、分離細胞のヒスタミン遊離試験を行った。試験に用いた卵白アレルゲンは、ヒスタミン遊離用緩衝液で4000、400、40、4、及び0.4ng/mlとなるように調製し、これによるIgE特異的なヒスタミン遊離率を前述の

式に従って算出した。図3に示すように、特異的なヒスタミン遊離率は卵白アレルゲン濃度に依存的であった。また、アレルゲン濃度がある濃度よりも濃くなるとヒスタミン遊離率が低下する、ベル状の濃度依存曲線となる例もあった。

【0071】4. ラジオイムノアッセイ(RIA)法によるヒスタミン濃度測定

上記実施例の3に示した方法で調製したBA312固相化マグネチックビーズを用いて、上記実施例の4と同様の方法で細胞分離と分離細胞のヒスタミン遊離試験を行った。得られた遊離ヒスタミン試料に関して、ラジオイムノアッセイ(RIA)法にてヒスタミン濃度の測定を行った。即ち、遊離ヒスタミン試料、若しくは標準ヒスタミン溶液100μlを試験管に分取し、0.3%ヒト血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウムを含む50

mMリン酸緩衝食塩液 pH7.0 (アッセイ緩衝液) で調製した¹²⁵I-標識ヒスタミン溶液 (10KBq/ml) 100 μ l、及びアッセイ緩衝液で調製した抗ヒスタミン抗体溶液 100 μ l を加えて、4℃で2時間反応を行った。これに、0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝食塩液 pH7.0 (50mMPBS) で調製した2.5%牛 γ -グロブリン溶液 100 μ l、及び50mMPBSで調製した25%ポリエチレングリコール (PEG #6000) 溶液 500 μ l を加えて4℃で10分間反応を行った。反応終了後、4℃で20分間 1800 \times g で遠心分離を行い、沈みの放射活性を測定した。図4に得られた標準曲線を示す。

【0072】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体は担体に固相化後も抗体活性を保持し、また、アレルゲンや抗IgE抗体負荷によるケミカルメディエーター遊離を阻害せず、かつ非特異的なケミカルメディエーターの遊離を誘発しないので、IgEを介した特異的なケミカルメディエーター遊離試験に適した好塩基球を分離することができる。また、本発明の好塩基球の分離方法は、簡便に血球から好塩基球を分離することができるので、従来煩雑な操作を要したヒスタミン遊離試験を簡便に行うことが*

＊できる。さらに本発明の好塩基球の分離方法により得られた細胞集団は、従来取り扱いに特別な技術を必要としたロイコトリエンやPAFなどの好塩基球由来ケミカルメディエーターを対象とした遊離試験にも、簡便に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

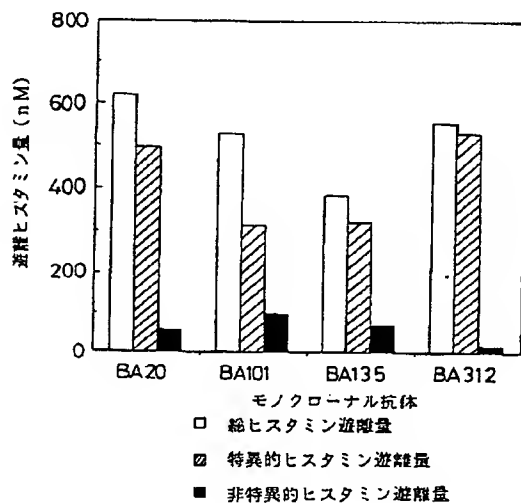
【図1】マグネチックビーズに固相化した本発明のモノクローナル抗体を用いて分離した好塩基球からの総ヒスタミン量 (白色棒グラフ)、IgEを介した特異的なヒスタミン遊離の量 (斜線棒グラフ)、および非特異的なヒスタミン遊離の量 (黒色棒グラフ) を示すグラフである。

【図2】全血及びBA312固相化マグネチックビーズによる分離細胞を用いたヒスタミン遊離反応のモノクローナル抗ヒトIgE抗体濃度依存曲線である。

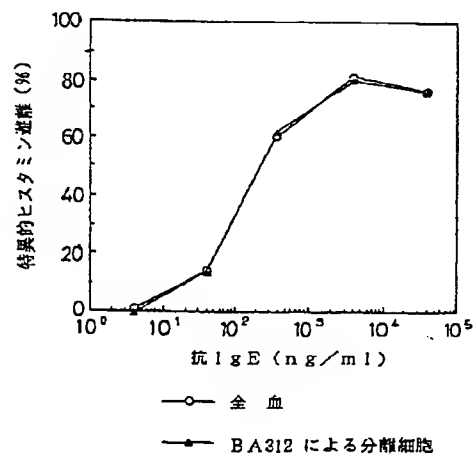
【図3】BA312固相化マグネチックビーズによる小児アトピー性皮膚炎患者血液由来分離細胞を用いた、ヒスタミン遊離反応の卵白アレルゲン濃度依存曲線である。

【図4】ラジオイムノアッセイにより得られたヒスタミン濃度の標準曲線である。B/B₀は標識された結合被検体の%を示す。

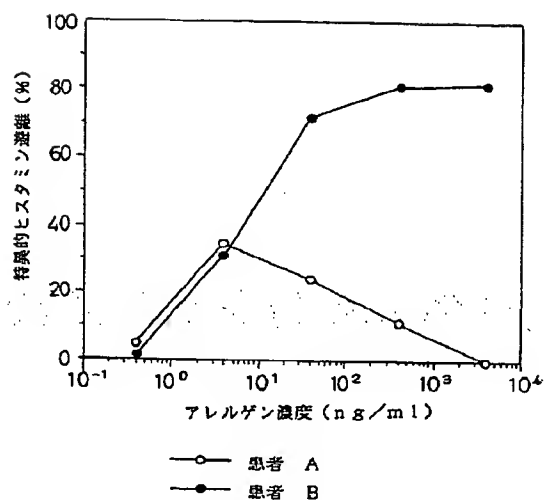
【図1】



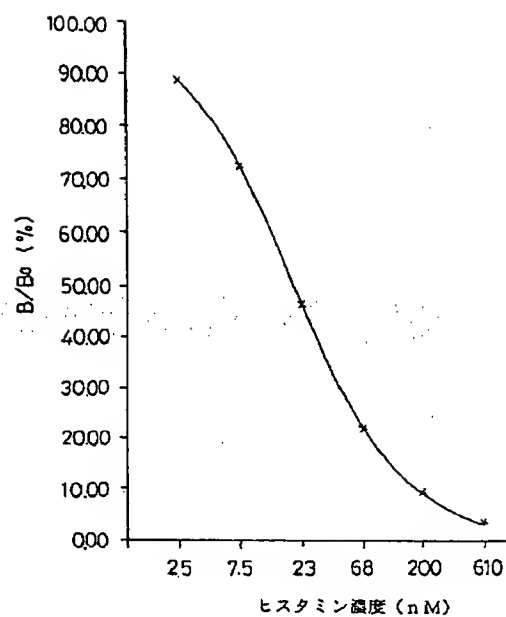
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

C 0 7 K 17/14

C 1 2 N 5/20

15/06

G 0 1 N 33/53

33/577

/(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8318-4H

Q 8310-2J

B 9015-2J